B1401 MC

体外診断用医薬品

**2014年3月改訂（第5版、____：訂正箇所）
*2009年1月改訂（第4版）

日本標準商品分類番号
877435

承認番号
21000AMY00180000

この添付文書をよく読んでから使用して下さい。

アルカリ性フォスファターゼアイソザイムキット

オステオリンクス®「BAP」

－血清中骨型アルカリフォスファターゼの測定－

■全般的な注意

(1)本品は、体外診断用医薬品です。それ以外の目的には使用しないで下さい。
(2)診断・治療効果の判定は、本法を含めて他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断して下さい。
(3)添付文書以外の使用方法については保証できませんので注意して下さい。
(4)標準液及びコントロールには、ヒト由来成分が含まれていますので、感染の危険があるものとして取り扱って下さい。
(5)本品には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれていますので、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着したりした場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けて下さい。
(6)使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用して下さい。

■形状・構造等（キットの構成）

本品は、以下の試薬から構成されており、96テスト用です。

構成	数量
(1)抗体結合プレート（マウス抗骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)モノクローナル抗体：1ウエル当たり、標準液F(140U/L)における吸光度が1.5～3.0を示す量）	1プレート（マイクロウエルプレート：8ウエル×12ピース）
(2)標準液A（BAP 0U/L）	1バイアル（液剤：0.4mL）
(3)標準液B（BAP 2U/L）	1バイアル（液剤：0.4mL）
(4)標準液C（BAP 20U/L）	1バイアル（液剤：0.4mL）
(5)標準液D（BAP 50U/L）	1バイアル（液剤：0.4mL）
(6)標準液E（BAP 80U/L）	1バイアル（液剤：0.4mL）
(7)標準液F（BAP 140U/L）	1バイアル（液剤：0.4mL）
(8)コントロール低濃度	1バイアル（液剤：0.4mL）
(9)コントロール高濃度	1バイアル（液剤：0.4mL）
(10)測定用緩衝液	1バイアル（液剤：27mL）
(11)基質錠剤（p－ニトロフェニルリン酸二ナトリウム：0.3mg/1回測定分中）	3錠（錠剤：基質各20mg含有）
(12)基質用緩衝液	3バイアル（液剤：各10mL）
(13)濃縮洗浄液	1バイアル（液剤：55mL）
(14)停止液	1バイアル（液剤：15mL）

■使用目的

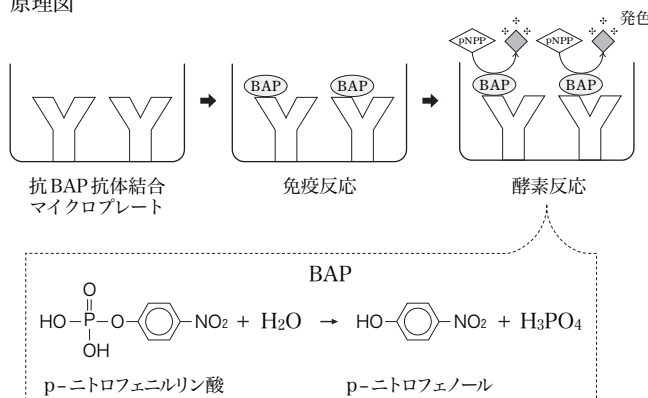
血清中の骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）の測定

■測定原理

本品は、マイクロプレートを用いたEIA法の原理に基づき、検体中のBAP濃度を測定します。マイクロプレートのウエルに固相化したマウス抗BAPモノクローナル抗体で、検体中のBAPを選択的に捕捉した後、アルカリフォスファターゼの基質（p－ニトロフェニルリン酸）を添加して、捕捉されたBAPによる酵素反応を行い、生成物（p－ニトロフェノール）の発色を測定します。同時にBAP標準液を用いて測定、作成された標準曲線より、検体中のBAP濃度（U/L）を求めます。

本品は、他のアイソザイムに対する交差反応の少ないマウスモノクローナル抗体を使用しているため、特異的に骨型アルカリフォスファターゼを測定することが可能です[1]。

原理図

$$HO-P(=O)(OH)-O-C_6H_4-NO_2 + H_2O \rightarrow HO-C_6H_4-NO_2 + H_3PO_4$$

■操作上の注意

1. 測定試料（検体）の取扱い
 (1)検体は、できるだけ新鮮な血清をそのまま用いて下さい。
 (2)検体を保存する場合は、2～8℃（5日以内）又は－20℃以下（最長12ヵ月）で保存して下さい。
 (3)熱処理（非働化）した血清は使用しないで下さい。
 (4)4回以上凍結融解を繰り返した血清は使用しないで下さい。
2. 妨害物質
 本品は、血清中の下記物質の下記濃度までは測定値に影響を受けませんでした。

物質	濃度
ビリルビン・F（遊離型）	18.2mg/dL
ビリルビン・C（抱合型）	21.8mg/dL
溶血ヘモグロビン	530mg/dL
乳び	1940（ホルマジン濁度数）
リウマトイド因子（IgM型）	540IU/mL

 ただし、ALP活性はその他様々な薬剤、因子に影響を受けることが報告されていますので[2]、投薬などがある患者検体の測定には十分注意して下さい。
3. その他の注意点
 (1)すべての操作は、室内温度を20～28℃に調整した実験室内で行ってください。
 (2)測定は原則として、二重測定で行ってください。
 (3)標準曲線は、測定毎に作成して下さい。
 (4)140U/Lを超えた検体は、測定用緩衝液で10倍希釈して再測定して下さい。
 (5)2.0以上の吸光度測定の性能が保証されていないプレートリーダーを使用する場合で、標準液F（140U/L）の測定吸光度が2.0を超えた時は、その値は信頼できないので、標準液Fの値を使用しないで標準曲線の作成を行って下さい。
 (6)標準液F（140U/L）の吸光度が1.0より低くなった時は、その回の測定の結果は信頼できないので測定をやり直して下さい。
 (7)再現性の良い結果を得るために、さらに以下の点に注意して下さい。
 **①プレートウエルに血清検体を添加後、プレートをゆるやかに振とうして下さい。
 ②基質用緩衝液は、使用前に十分に室内温度（20～28℃）に戻して下さい。

③酵素反応は基質溶液と停止液の添加順序、時間間隔を正確に一定にして下さい。
④試薬の添加には、時間管理をより正確にするために、できるだけマルチチャンネルピペットまたは連続分注器を使用して下さい。
⑤測定結果の再現性のよい解析を行うためには、標準曲線の作成及び測定値の算出に、二次曲線近似解析用ソフトウェアを使用することが望まれます。

■用法・用量(操作方法)

1. 必要な器具・器材・試料等
(1)蒸留水または脱イオン水
(2)濃縮洗浄液希釈用コンテナー
(3)マイクロピペット(20μL)
(4)連続分注器あるいはマルチチャンネルピペット(100～300μL)
(5)マイクロプレートリーダー(405nmフィルター内蔵)

2. 試薬の調製法
各試薬は、使用前に室内温度(20～28℃)に戻して使用して下さい。また、直射日光には曝さないで下さい。
(1)濃縮洗浄液を脱イオン水または蒸留水で10倍に希釈し、必要量の希釈洗浄溶液を準備します。(希釈洗浄溶液は、20～28℃ で保存して、24時間以内に使用して下さい。)
(2)基質用緩衝液1バイアルに基質錠剤1錠を添加し、必要量の基質溶液を準備します。
(基質錠剤は、使用する30～60分前に添加し、使用まで20～28℃で保存して下さい。)

表1. 試 薬 の 必 要 量 (参考)

	ストリップ(8×1)の数			
	4	6	8	12
測定可能検体数※	8	16	24	40
基質バイアル数	1	1	2※※	2※※
希釈洗浄溶液(mL)	100	150	200	300

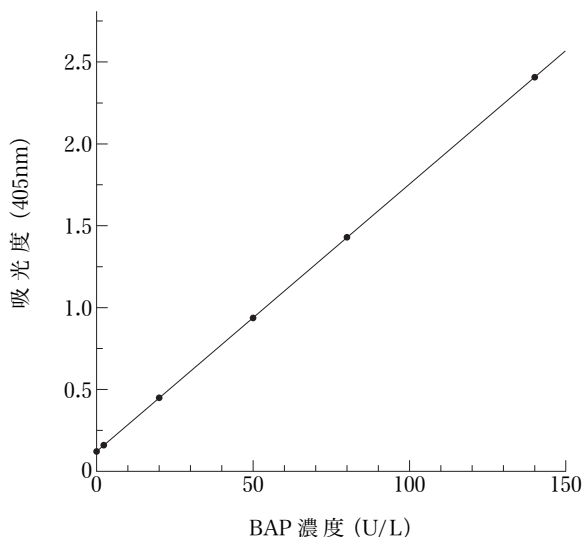
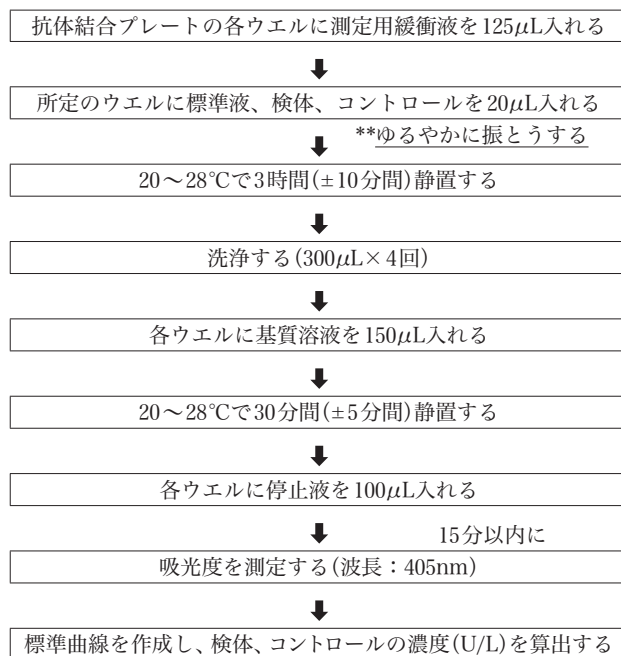
※二重測定する場合
※※ 2バイアル使用するときは、使用前に中身を合わせて混合して下さい。

3. 測定方法
(1)抗体結合プレートの入ったホイル袋から、使用直前にプレートを取り出します。使用するストリップには、アッセイ中に枠から外れて混乱しないように、ラベリングを行います。ストリップを一度に全部使用しないときは、残りのストリップを袋に戻してしっかり密封して下さい。
(2)各ウエルに、測定用緩衝液を125μLずつ入れます。
**(3)所定のウエルに、BAP標準液、コントロール又は検体を20μLずつ添加します。添加後、プレートをゆるやかに振とうしてください。ピペットでの吐出を繰り返すなどの激しい混和はしないようにしてください。
(4)20～28℃で3時間(±10分間)静置反応させます。
(5)使用する30～60分前に、基質用緩衝液の必要バイアル数(表1参照)に、基質錠剤を添加し、そのまま使用まで20～28℃で放置し、使用直前にバイアルを強く振って完全に溶解、混合します。(2バイアル使用するときは、使用前に中身を合わせて混合して下さい。)
(6)以下の要領でウエルを洗浄します。
①プレートを手でひっくり返して振り、ウエル内の反応液を捨てます。
②プレートの各ウエルに、希釈洗浄溶液300μLを入れます。
③①と同様の操作で希釈洗浄溶液を除去します。
④さらに②～③の操作を3回繰り返します。(計4回)
⑤最後の洗浄溶液除去後、さらにプレートを逆さにしたまま、机の上に敷いたペーパータオルにプレートを強く叩きつけてウエル内の溶液を完全に除きます。
(7)各ウエルに(5)で調製した基質溶液を150μLずつ入れます。
(8)20～28℃で30分間(±5分間)静置反応させます。
(9)反応後、各ウエルに基質溶液を加えた順に停止液を100μLずつ加えます。
(10)ウエル内に気泡がないこと、ウエルの底が汚れていないことを確認の上、プレートリーダーで405nmの吸光度を測定します。
(停止液添加後、15分以内に測定して下さい。また、2波長のプレートリーダーを使用する時は、対照側の波長を600～650nmに設定して下さい。)

4. 濃度の算出方法
(1)正方眼グラフ用紙の横軸に標準液A～FのBAP濃度(U/L)、縦軸に各吸光度をプロットし、標準曲線を作成します。
(2)上記標準曲線から、コントロールおよび検体の濃度(U/L)を求めます。
(3)あらかじめ希釈された検体を測定した場合、元の検体の濃度は、(2)で求めた濃度に希釈倍率を乗じた値となります。
(4)再現性の良い解析を行うためには、標準曲線の作成、検体濃度の算出に二次曲線近似解析用ソフトウェアを使用することが望まれます。

標 準 曲 線 の 例
標準液、0, 2, 20, 50, 80, 140 U/L

操 作 手 順 概 略

抗体結合プレートの各ウエルに測定用緩衝液を125μL入れる
↓
所定のウエルに標準液、検体、コントロールを20μL入れる
↓ **ゆるやかに振とうする
20～28℃で3時間(±10分間)静置する
↓
洗浄する(300μL×4回)
↓
各ウエルに基質溶液を150μL入れる
↓
20～28℃で30分間(±5分間)静置する
↓
各ウエルに停止液を100μL入れる
 15分以内に
吸光度を測定する(波長：405nm)
↓
標準曲線を作成し、検体、コントロールの濃度(U/L)を算出する

■測定結果の判定法

1. 測定値の単位は、U/Lです。1Uとは2–アミノ2–メチル–1–プロパノール(AMP)緩衝液中で、25℃で1分間に1μmolのpNPPを加水分解するBAP活性量に相当します。

2. 測定値は、測定する条件によって変動しますので、本品の測定値と、他の条件で測定されたALP測定値を直接比較することはできません。

3. 参考基準値
   (1)本品を用いて、健常男性(n＝123、年齢25～78歳)、正常骨量健常女性(n＝151、年齢20～68歳)の血清BAP値を測定したときの参考基準値は以下の通りでした[3)]。
   男性：13.0～33.9U/L
   女性： 9.6～35.4U/L
   (2)基準値は、母集団の年齢等で異なる可能性がありますので、各施設で個々に合わせた基準値を設定することが望まれます。
   (3)上記の参考基準値は、代謝性骨疾患検体でのカットオフ値の参照として用いますが、癌症例検体の測定においては90％値(男性 29.4U/L, 女性 28.2U/L)[3)] を参照して下さい。

■臨床的意義

1. 骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)とは
   アルカリフォスファターゼ(ALP)は、アルカリの条件下でリン酸エステルより無機リン酸を遊離させる働きをもち、生体内に広く分布している酵素です。組織の由来を異にする複数のアイソザイムが存在しますが、その中で、血中に出現するアイソザイムは、骨型ALP、肝臓型ALP、胎盤型ALP、小腸型ALPです。その中の1つ骨型ALP(BAP)は、骨芽細胞で産出され、その膜に結合した状態で存在するアイソザイムですが、随時血中にも放出され、その血中レベルは、骨芽細胞機能(数)と相関するといわれています。従って、血中のBAPレベルを測ることは、骨芽細胞の機能状態ひいては骨形成状態を知る指標になると考えられています。文献では、原発性副甲状腺機能亢進症、骨ページェット病、甲状腺機能亢進症、骨軟化症・クル病、閉経後骨粗鬆症などの代謝性骨疾患や、原発性骨腫瘍、悪性腫瘍に伴う高Ca血症、多発性骨髄腫、癌の骨転移及び骨折の治癒期において、血中骨型ALP濃度は高値を示すことや、慢性腎不全に伴う腎性骨異栄養症の診断指標としての有用性が報告されています。また、治療経過観察においては、成長ホルモン分泌不全症での成長ホルモン治療、透析症例での副甲状腺機能亢進症に対するビタミンD_3治療、骨粗鬆症の薬物治療による治療効果を反映する事が報告されています[4)]。よって、血中のBAP濃度の測定は、骨回転に異常を起こす疾患の診断やその治療の指標として有用であると考えられます。

2. 本品による血清中BAP測定の臨床上の意義
   オステオリンクス®「BAP」は、マイクロプレートを用いたEIA法により、血清中の骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)濃度(U/L)を定量する体外診断用医薬品です。本品による血清中BAP測定について、以下の臨床上の意義が認められています。
   - 慢性腎不全による透析患者における腎性骨異栄養症の鑑別診断
   - 透析患者における治療時の骨代謝回転の指標
   - 閉経後骨粗鬆症の骨吸収抑制剤による治療時の経過観察
   - 癌の骨転移の補助診断
   - 原発性副甲状腺機能亢進症、骨ページェット病の補助診断

3. 臨床性能試験データ
   (1)乳癌、前立腺癌、及びその他の癌(大腸癌、子宮頸部癌、膀胱癌、胃癌等)の骨転移の補助診断として臨床有用性が高い[5)]。
   ①骨シンチグラフィにより骨転移の有無を分別した検討において、血清骨型ALPは骨転移群で高値を示し、骨転移の指標として有用性が高い(図1)。
   ②骨転移の進展に伴い血清骨型ALPは高値化し、また骨転移の進展に伴い有病正診率が上昇した。
   ③本品による血清骨型ALP測定は、肝転移による影響が少ないことから、肝転移存在下での骨転移診断、肝転移と骨転移間の判別診断において、補助的診断として有用性が高い。

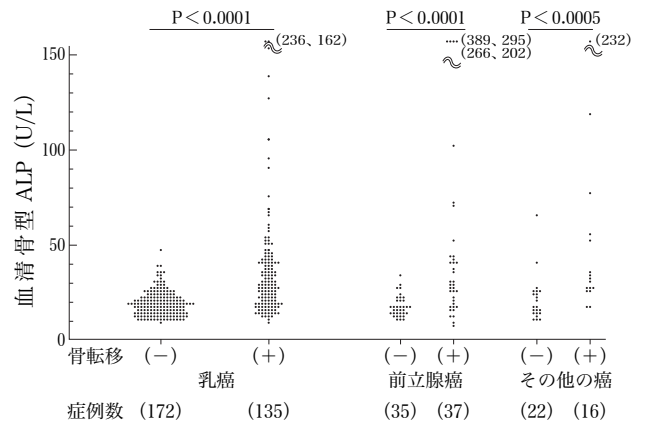



図1. 骨型ALP(BAP)の各癌における骨転移群、非転移群間の比較

   (2)慢性腎不全による血液透析患者における腎性骨異栄養症の指標として臨床有用性が高い[3)]。
   ①骨X線検査による手指中節骨での骨膜下吸収の有無での検討において、血清骨型ALPは高い有病正診率、無病正診率を示した。(図2、有病正診率：100%、無病正診率：91%)
   ②本品による血清骨型ALP測定値は、骨X線検査による手指中節骨の骨膜下吸収の進展度と高い相関($r=0.83$, $p<0.0001$, $n=84$)を認め、血清骨型ALP測定による腎性骨異栄養症の病態把握に臨床的意義が認められた[6)]。

   (3)原発性副甲状腺機能亢進症、骨ページェット病で高い有病正診率(原発性副甲状腺機能亢進症 83%、骨ページェット病100%)を示し、補助診断として有用である[3)]。(図2)

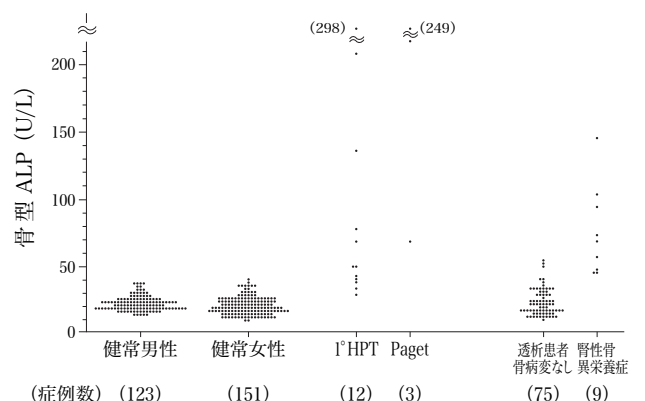



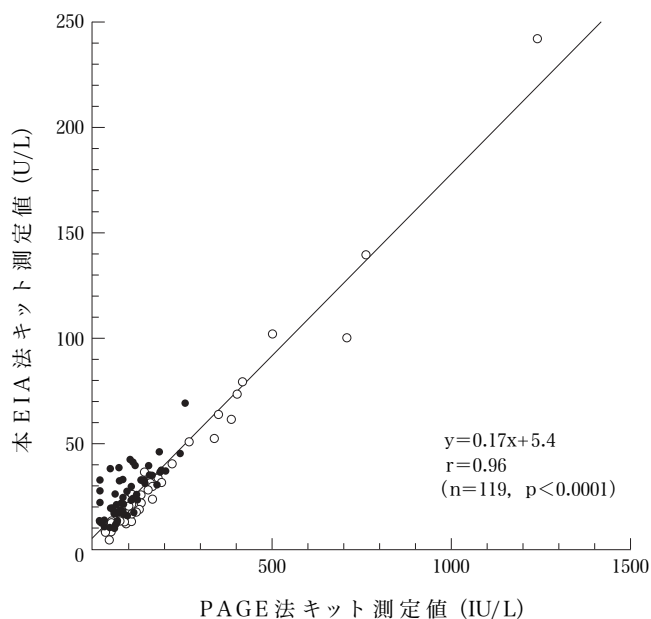
図2. 骨型ALP(BAP)の各種代謝性骨疾患群間の比較

■性能

1. 性能
   (1)感度
   標準液A(0U/L)を測定するとき、その吸光度は0.16以下である。
   標準液F(140U/L)を測定するとき、その吸光度は1.50以上である。
   標準液A(0U/L)と標準液B(2U/L)を測定するとき、標準液Bの吸光度は、標準液Aの吸光度にその吸光度の標準偏差の2倍を加えた値より高値である。
   (2)正確性
   以下の2種類の濃度範囲にある既知濃度の管理用血清を測定するとき、得られた値はそれぞれ表示値の±20％以内である。
   (低濃度：9.0～30.0U/L、高濃度：60.0～110.0U/L)
   (3)同時再現性
   管理用血清を6回同時に測定するとき、その変動係数は15％以下である。
   (4)測定範囲
   本品の測定範囲は、2～140U/Lである。

2. 相関性試験成績
   本品測定値と既承認のPAGE法によるALPアイソザイム測定キット(アルフォー、株式会社常光)による骨型ALPアイソザイム測定値との相関は、下記の通り良好でした。

(PAGE法キットはアイソザイムの分画%を求めるものですので、別に求めた総ALP活性に、骨型アイソザイムの分画%を乗じて骨型ALP測定値としました。測定値は、スカンジナビア臨床化学会準拠の測定法に基づいて求めました。)

• 肝転移・肝疾患・胆嚢疾患(n=54)
○ 癌症例(非肝転移症例, 骨転移症例含む)(n=65)

3. 較正用の基準物質(標準物質)
自社基準品。骨肉腫細胞株(SAOS-2)から精製されたBAPを使用[1]。

■使用上又は取扱い上の注意

1. 取扱い上(危険防止)の注意

(1)試料(検体)は、HIV、HBV、HCV等のウイルスあるいは細菌の感染の恐れがあるものとして取り扱って下さい。検査にあたっては、感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、また、口によるピペッティングを行わないで下さい。

(2)本品の構成試薬のうち、各標準液およびコントロールは、HBs抗原、HCV抗体及びHIV抗体ともに陰性であることを確認済みですが、患者検体と同様、感染性のあるものとして取り扱って下さい。

(3)本品の試薬には、防腐剤としてアジ化ナトリウムを含んでいます。使用に際しては、試薬が直接皮膚に付着したり、目に入ったりしないよう注意して下さい。

(4)停止液には、0.5mol/L水酸化ナトリウムを含んでいます。使用に際しては、皮膚や目、衣服に付かないようにし、取扱いには十分注意して下さい。

(5)試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けて下さい。

2. 使用上の注意

(1)本品は、冷暗所(2〜8℃)に保存して下さい。

(2)外箱に印刷された使用期限を越えたキットは使用しないで下さい。

(3)ロットの異なるキットの構成試薬を組み合わせて使用しないで下さい。

3. 廃棄上の注意

(1)使用後の検体、試薬、器具及び廃液は、次亜塩素酸ナトリウム(有効濃度1000ppm、1時間以上浸漬)又はグルタールアルデヒド(2%、1時間以上浸漬)による消毒処理あるいはオートクレーブ(121℃、20分以上)による滅菌処理を行って下さい。

(2)本品の試薬には、防腐剤としてアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは、酸と混合すると有毒ガスを生じますので、廃棄時には酸と混合しないようにして下さい。また、鉛管、銅管と反応して爆発性の強い金属アジドを生成することがありますので、廃棄の際は多量の水を共に流して下さい。

(3)試薬及び器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理して下さい。

■貯蔵方法・有効期間

貯蔵方法:2〜8℃に保存する。
有効期間:製造後18ヵ月(使用期限は、外箱に表示)

■包装単位

1キット96回測定用
(測定検体数:40検体〔二重測定の場合〕)

■主要文献

1) Gomez B. et al.:Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum.
Clin. Chem., 41:1560, 1995.

2) 菰田二一他:アルカリ性ホスファターゼ(AP), APアイソザイム
medicina, 26増刊号:1946, 1989

3) 三木隆己他:EIA法による血清中骨型アルカリフォスファターゼ測定の検討
ホルモンと臨床, 45(10):999, 1997.

4) 神崎晋他:骨形成マーカー
腎と骨代謝, 8:287, 1995.

5) 小泉満他:転移性骨腫瘍評価における骨形成マーカー血清骨型アルカリフォスファターゼの有用性の検討
ホルモンと臨床, 45(11):1091, 1997.

6) 三浦義昭他:慢性腎不全患者におけるEIA法による骨型ALP測定の臨床的検討
ホルモンと臨床, 45(12):1187, 1997.

**■問い合わせ先

DSファーマバイオメディカル株式会社
学術開発第1グループ
大阪府吹田市江の木町33番94号(〒564-0053)
電話 06-6337-5941, FAX 06-6337-6020

**製造販売元
DSファーマバイオメディカル株式会社
大阪府吹田市江坂町2丁目1番43号(〒564-0063)
海外製造元 米国 カイデル コーポレーション

B1401 MC